

医療応用を目指した糖鎖プローブの創成：

インフルエンザウイルス感染阻害を目的としたシアリルラクトース誘導体の合成

Development of carbohydrate probes toward medicinal application : synthesis of sialyllactose derivatives as inhibitor against influenza virus infection

山口 真 範 浦 野 文 絵 川 嶋 佑 典
Masanori YAMAGUCHI* Ayae URANO Yusuke KAWASHIMA

木 村 憲 喜 神 田 和 香 子
Noriyoshi KIMURA Wakako KANDA

(和歌山大学教育学部化学教室)

2010年11月2日受理

Abstract

Two sialyllactose derivatives were prepared by incubation of colomic acid and lactose in the presence of a neuraminidase from *Streptococcus sp.*

These sialyllactose derivatives become prospect for inhibitor against avian and human influenza virus infection.

・はじめに

糖は食物(エネルギー源)として利用されるだけでなく真核生物の細胞表面にも存在し、細胞の分化、接着、免疫調節など様々な生命現象を担っている。生体内での糖は、単糖が鎖のようにつながった糖鎖という形で、一つの細胞表面に約500本から数10万本存在しており、それぞれに固有の役割を持ち、生態の恒常性の維持には欠かせない分子の一つである。それゆえ糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれており、近年急速に糖鎖研究が進められている^{1), 2), 3)}。

本研究では、インフルエンザウイルスの感染に関わる糖鎖を効率的に合成し、医療へ応用することを目的とした。インフルエンザは、世界で最も広く存在する感染症の一つである。2000年から2006年にかけての高病原性鳥インフルエンザの発生や、2009年の新型インフルエンザのパンデミックは記憶に新しい。インフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染と、そのウイルスの増殖により発症する。ウイルスは、受容体となる糖鎖が発現している宿主細胞に感染し、その細胞の代謝系を利用することで増殖する。

その感染には、ウイルス表面に発現されているヘマグルチニンとノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)という2種のタンパク質と、宿主細胞表面に発現されている、先端にシアル酸が結合したシアロ糖鎖が必要不可欠である。それぞれの役割について述べると、ヘマグルチニンは、宿主細胞表面に発現しているシアロ糖鎖を認識し吸着する働きを担っており、ウイルスの宿主細胞内への侵入を可能にする。次に、宿主細胞内で増殖し

たウイルスは、細胞外へ放出され、新たな細胞へ感染するというステップをとるのであるが、その時ウイルスのヘマグルチニンと飛び出そうとしている宿主細胞のシアロ糖鎖が結合してしまい放出が妨げられることになる。それを防ぐために、ウイルス表面に発現されているシアリダーゼが宿主細胞のシアロ糖鎖を切り放すことでウイルスの細胞外への放出を可能としている。以上のように、インフルエンザウイルスは糖鎖を介して感染、増殖、放出を繰り返す^{4), 5)} (図1)。

・インフルエンザウイルス感染阻害を目的とした糖鎖工学ストラテジー

インフルエンザウイルスには、トリに感染するもの、ブタに感染するもの、ヒトに感染するものがあり、それぞれのウイルス表面に発現されているヘマグルチニンが認識するシアロ糖鎖は異なっている。トリに感染するインフルエンザウイルスはシアル酸がガラクトースに $\alpha(2-3)$ 結合したシアロ糖鎖を、ヒトに感染するものは $\alpha(2-6)$ 結合したシアロ糖鎖を認識している。またブタに感染するものは、 $\alpha(2-3)$ 結合、 $\alpha(2-6)$ 結合したシアロ糖鎖の双方を認識し、細胞へ吸着、侵入している⁶⁾(図2)。

インフルエンザ感染阻害を目的とする場合、この吸着のステップを阻害することが最も効率的なストラテジーの一つと言える。

本研究では、インフルエンザウイルスが認識するシアロ糖鎖の末端部分(シアリルガラクトース)を含んでいるシアリルラクトース誘導体の効率的な合成方法の

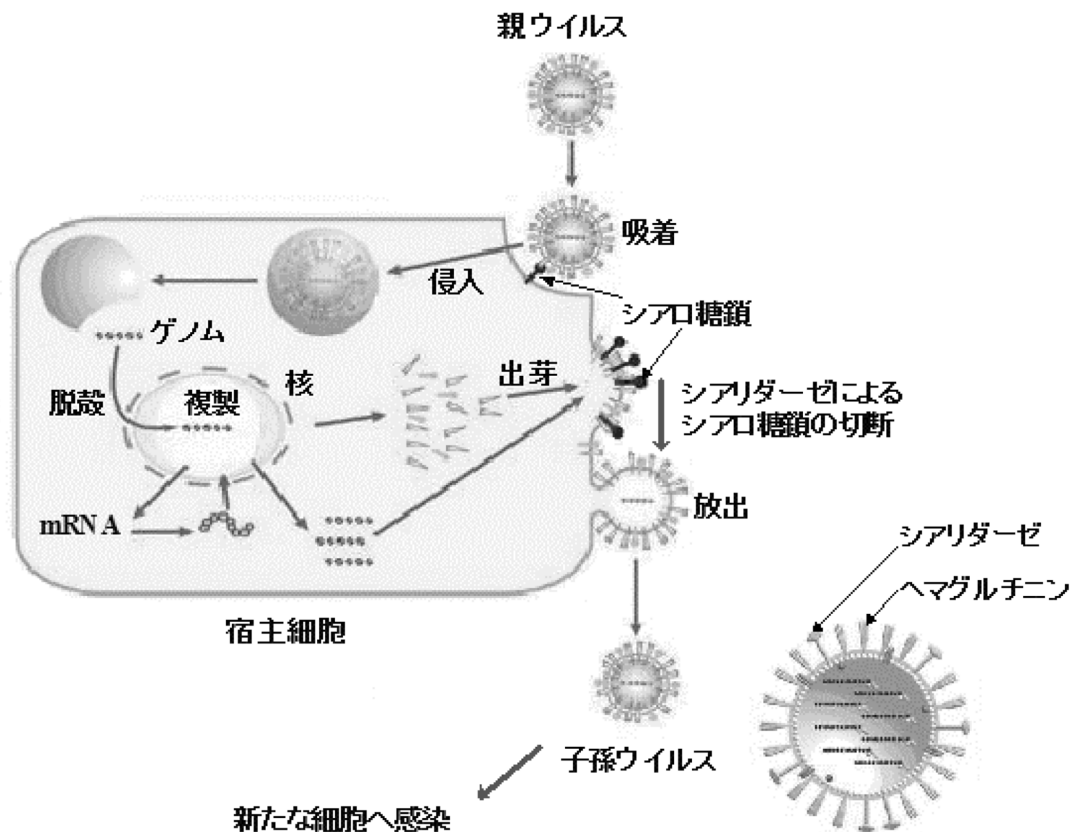


図1 インフルエンザウイルスの構造と感染過程

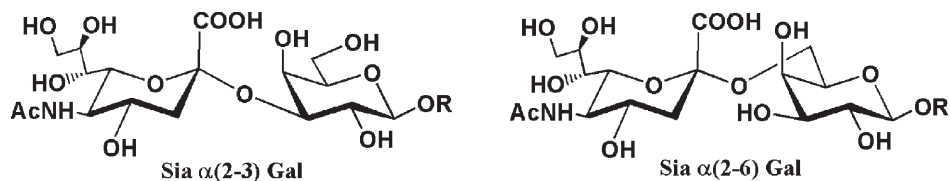


図2 インフルエンザウイルスが認識するシアロ糖鎖部分

確立を目的とした。これらの誘導体はインフルエンザウイルスが認識するシアロ糖鎖のエッセンスであるため、インフルエンザウイルスの効率的な感染阻害が見込まれる。よって、これらの誘導体を将来的にインフルエンザの生化学的研究素材、治療薬、マスクのフィルター素材などへ応用することを目的として研究を行った。

・目的糖鎖の合成戦略

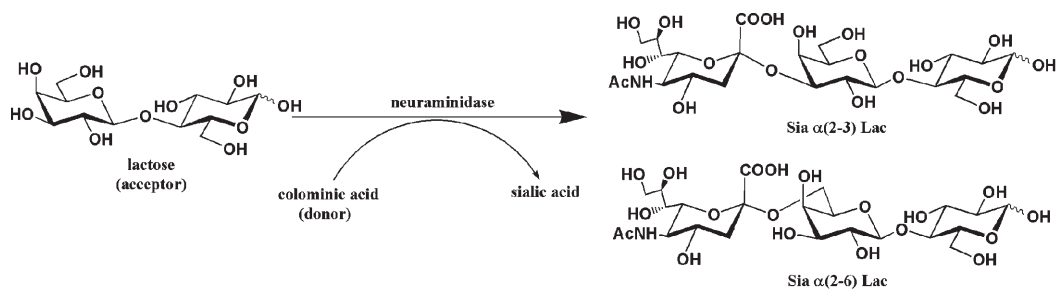
目的とするシアロ糖鎖を得るため、本研究は酵素化学的合成法を取ることにした。この合成法には代表的なものとして2つある。

第一の方法は糖供与体としてヌクレオチド糖を使用し、糖転移酵素であるグリコシルトランスフェラーゼを用いて受容体糖に糖を転移させ目的とする糖鎖を合成するものである。この方法は目的とする糖鎖が高収率で得られる大変有用な手法であるが、合成の際に使

用するヌクレオチド糖とグリコシルトランスフェラーゼは調製が非常に煩雑で大変高価である。また酵素の基質特異性が高く、特定の構造の受容体にしか糖を転移できないことが多い。以上のようなことからこの方法は、実用化を目指した場合、大きな課題を抱えることとなる。

第二の方法は糖供与体として天然に存在しているポリマー糖などを用い、加水分解酵素であるグリコシダーゼを用いて受容体糖に糖を転移させ合成するものである。グリコシダーゼは本来、加水分解することにより糖を切り出す酵素であるのでこの論旨は矛盾する。もちろんグリコシダーゼは圧倒的に加水分解活性が高いのであるが、その逆反応である糖転移活性も低活性ながら持ち合わせている場合がある。その逆反応の活性を、条件検討することにより最大限に高め、目的糖鎖を得るのがこの方法である。

この手法は収率面では第一の方法に及ばないが、使



scheme 1

用する供与体と酵素が共に調製が比較的容易で、かつ酵素の基質特異性が低い。よって多様なアナログを合成することが可能であるという多くのメリットがある。実用化を目指す本研究はこれら二つの手法のうち、第二の方法を選択して目的としたシアロ糖鎖を合成することにした。

すなわちシアル酸供与体(donor)として、天然物由来のシアル酸のポリマーであるコロミン酸(colominic acid)を、受容体(acceptor)としてラクトース用い、酵素はシアル酸加水分解酵素である*Streptococcus* sp.由来のノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)を用いた(scheme 1)。

・結果と考察

Streptococcus sp.由来のノイラミニダーゼが糖転移活性を有しているかを調べた。本酵素の至適pHは6.5であることが知られている⁷⁾。(加水分解活性がpH=6.5で最大となる)このpHを基準として糖転移活性が認められるpH条件を以下に示す手順により調査した。

pH条件を検討する緩衝液として50 mM酢酸ナトリウムバッファーを用い、表1に示したpHのものをそれぞれ調製した。次に飽和ラクトース溶液、コロミン酸溶液(200 mg/mL)、ノイラミニダーゼ溶液(0.01 U)をそれぞれ①から⑥の条件で混合し、37℃にて43時間インキュベートした(表1)。1 Unitは1分間に1 μmolのシアル酸を遊離する酵素量を示している。

反応終了後、生成物を薄層クロマトグラフィー(展開溶媒：6：2：1 propanol-ammonia water-H₂O)

にて確認した。その結果、①から③の条件で糖転移活性が賦活化され、目的とした糖転移物であるシアリルラクトースの生成が認められた。④から⑥の条件では糖転移物は認められず、遊離したシアル酸とラクトースが回収された。また、pH=6.5以上のpHでは一切の糖転移物は得られなかった。これらの結果より、本酵素が糖転移活性を持つことを新規に見出し、その活性が発揮されるpHは3.5から4.5の間であることを突き止めた。また、①から③の条件の生成物量を比較した結果、②、①、③の順に目的物が多く生成していたため、pH=4の条件がラクトースへのシアル酸糖転移の至適pHであることを明らかにした。

次に、糖転移反応の至適ラクトース量とコロミン酸量を調査するため、表1の②の条件を元に、ラクトース溶液とコロミン酸溶液の量を変え、⑦から⑨の条件で混合し、pH=4、37℃にて43時間インキュベートした(表2)。

目的物の生成量を比較した結果、最も多くシアリルラクトースの得られた⑨の条件をラクトースとコロミン酸量の至適条件と定めた。

最後に、反応の至適温度を調査するため、表2の⑨の条件を元に、反応温度を37℃からいくつか温度を変更し、43時間インキュベートした。目的物の生成量を比較した結果、最も多くシアリルラクトースが得られた47℃を至適温度と定めた。

以上の条件検討の結果より、ラクトースへのシアル酸転移反応の至適条件は表3に示した条件であることを新たに見出した(表3)。

	pH	飽和ラクトース溶液 (μL)	コロミン酸溶液 (μL)	ノイラミニダーゼ溶液 (U)
①	3.5	20	20	0.01
②	4	20	20	0.01
③	4.5	20	20	0.01
④	5	20	20	0.01
⑤	5.6	20	20	0.01
⑥	6.5	20	20	0.01

表1 pHの検討

	飽和ラクトース溶液 (μL)	コロミン酸溶液 (μL)	ノイラミニダーゼ溶液 (U)
⑦	20	20	0.01
⑧	10	30	0.01
⑨	30	10	0.01

表2 ラクトース、コロミン酸量の検討

pH	飽和ラクトース溶液 (μL)	コロミン酸溶液 (μL)	温度 (°C)
4	30	10	47

表3 シアリルラクトース合成の至適条件

・まとめ

本研究では、*Streptococcus sp.*由来のノイラミニダーゼを用いた糖転移反応により、シアリルラクトース誘導体の酵素的合成を達成した。得られた二種類のシアリルラクトースのうちSiaα(2-3)lactoseはトリ型インフルエンザ、Siaα(2-6)lactoseはヒト型インフルエンザ感染阻害活性が見込まれる。

また本研究において開発したシアリル化の方法は、ガン、免疫疾患などに関わるシアロ糖鎖合成にも応用することができ、効率的なシアロ糖鎖合成手法の一つと成り得る。

・実験の部

一般操作

コロミン酸、ノイラミニダーゼはナカライテスク株式会社製、ラクトースは和光純薬工業株式会社製、Sphadex G25はアマシャムバイオサイエンス社製のものを使用した。TLCはsilica gel 60 F254(merck, aluminum sheets)を用い、検出は発色試薬(10 % H₂SO₄-EtOH)によった。分子量の測定は島津製作所製 LCMS-2020を使用し、イオン源はAPCIを使用した。

シアリルラクトースの合成

コロミン酸溶液(10 μL)、飽和ラクトース溶液(30 μL)の混合溶液に、ノイラミニダーゼ溶液(1 μL; 0.01 U)を47℃にて添加し、その混合溶液を47℃にて43時間インキュベートした。反応終了後、反応液をC18 Sep Packカートリッジカラムに供し、溶出液には水(1 mL)を使用して疎水性成分を除いた。続いてその溶出液をSephadex G25カラム(280 x 10 mm)に供し、精製を行い目的化合物を得た。

展開溶媒: 6 : 2 : 1 propanol-ammonia water-H₂OにおけるR_f値はそれぞれSiaα(2-3)lactose, 0.43; Siaα(2-6)lactose, 0.32。

APCI-MS Calcd: C₂₃H₃₉NO₁₉ 633.21, found: 655.53(M+Na)⁺.

・謝辞

本研究の一部は若手研究(B) No. 21710230と平成22年度学長裁量経費の助成を受けて行った。

・参考文献

- 1) 安藤幸来、(2006)病気を防ぎ 病気を治す糖鎖のチカラ、pp 128-151.
- 2) 谷口直之、(2002)分かる実験医学シリーズ ポストゲノムの時代の糖鎖生物学がわかる、pp 15.
- 3) Demetriou, M., Migliorini, M., Argraves, W.S., Dedhar, S. (1995). Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J. Cell. Biol.*, 130, 383-392.
- 4) (a) 鈴木康夫、(1992)特集 生命科学を推進する分子ウイルス学、37巻、14号、pp 405-421. (b) 鈴木康夫、(1993)Mebio、10巻、5号、pp 32-42. (c) 鈴木康夫、箱守仙一郎、永井克孝、木幡 陽、(1993)グリコバイオロジーシリーズ、第6巻グリコバソロジー. (d) 鈴木康夫、永井克孝、(1994)ウイルス感染と糖鎖生物学、糖鎖II糖鎖と病態、pp 184-196.
- 5) 鈴木康夫、(1993)薬学雑誌、113巻、8号、pp 556-578.
- 6) (a) Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Suzuki, T., Kida, H., Kawaoka, Y. (1997). Differences of sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J. Virol.*, 71, 4, 3357-3362. (b) Sato, K., Hanagata, G., Kiso, M., Hasegawa, A., Suzuki, Y. (1998). Specificity of N1 and N2 sialidase subtypes of human influenza A virus for natural and synthetic gangliosides. *Glycobiology*, 8, 6, 527-532. (c) Masuda, H.,

- Suzuki, T., Sugiyama, Y., Horiike, G., Murakami, K., Miyamoto, D., Jwa Hidari, I-P. K., Ito, T., Kida, H., Kiso, M., Fukunaga, K., Ohuchi, M., Toyoda, T., Ishihama, A., Kawaoka, Y., Suzuki, Y. (1994). Substitution of amino acid residue in influenza A virus hemagglutinin affects recognition of sialyl - oligosaccharides containing *N* - glycolylneuraminic acid. *FEBS LETT.* 464, 71-74. (d) Kobasa, D., Kodihalli, S., Luo, M., Castrucci, R. M., Donatelli, I., Suzki, Y., Suzuki, T., Kawaoka, Y. (1999). Amino acid residues contributiong to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* 73, 6743-6751. (e) Ito, T., Suzuki, Y., Suzuki, T., Tanaka, A., Horimoto, T., Wells, K., Kida, H., Otsuki, K., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y. (2000). Recognition of *N* - glycolylneuraminic acid linked to galactose by alpha 2-3 linkage is associated with the intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J. Virol.*, 74, 19, 9300-9305.
- 7) Kiyohara, T., Terano, T., Nakano, K., Osawa, T. (1974). Purification and properties of a neuraminidase from *Streptococcus* K 6646. *Arch. Biochem. Biophys.*, 164, 575-582.